

OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING LACTIC ACID BACTERIUM AND DETECTION OF THE SAME BACTERIUM

Publication number: JP10210980

Publication date: 1998-08-11

Inventor: FUNABASHI WATARU

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C07H21/04; C12N15/09; C12Q1/68; C07H21/00;
C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09;
C07H21/04; C12Q1/68; C12N15/09; C12R1/225;
C12Q1/68; C12R1/225

- european:

Application number: JP19970028259 19970129

Priority number(s): JP19970028259 19970129

Report a data error here

Abstract of JP10210980

PROBLEM TO BE SOLVED: To rapidly carry out a microbial test on beer and its semifinished product, etc., with a high sensitivity and good specificity by conducting a polymerase chain reactional(PCR) method using an oligonucleotide prepared so as to specifically hybridize to a 16S ribosome gene of each of the plural bacteria belonging to the genus Lactobacillus as a primer. SOLUTION: An oligonucleotide prepared so as to specifically hybridize to a 16S ribosome gene of each of Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus coryniformis and Lactobacillus sp. AB No. 74 belonging to bacteria of the genus Lactobacillus g. 5'-CTGATTTCAACAATGAAGC-3') is used as a primer to carry out a PCR method. Each bacterium can definitely be detected and identified within 1-3 days.

~~~~~  
Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-210980

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月11日

| (51) Int.Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | F I           |
|---------------------------|-------|---------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 |
| C 0 7 H 21/04             |       | C 0 7 H 21/04 |
| C 1 2 Q 1/68              |       | C 1 2 Q 1/68  |
| // (C 1 2 N 15/09         | Z N A |               |
| C 1 2 R 1:225)            |       |               |

審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-28259

(22) 出願日 平成9年(1997) 1月29日

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

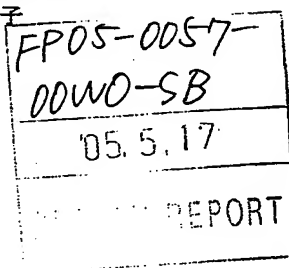
東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 船橋 互

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ

ール株式会社酒類研究所内

(74) 代理人 弁理士 舟橋 榮子



(54) 【発明の名称】 乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド及び該菌の検出方法

(57) 【要約】

【課題】 ビール混濁菌であるラクトバチルス属の菌、特にラクトバチルス プレビス菌、ラクトバチルス カゼイ菌、ラクトバチルス コリニフォルミス菌、ラクトバチルス プランタラム菌、ラクトバチルス スピーシーズ AB No. 74 菌を検出するためのオリゴヌクレオチド、及びこれを用いる該菌の検出方法を提供する。

【解決手段】 乳酸菌であるラクトバチルス属由来の16S rRNA遺伝子と選択的にハイブリダイズするヌクレオチド配列または該配列に対する相補的配列を有することを特徴とするヌクレオチド。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳酸菌であるラクトバチルス属由来の16S rRNA遺伝子と選択的にハイブリダイズするヌクレオチド配列または該配列に対する相補的配列を有することを特徴とするヌクレオチド。

【請求項2】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス プレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス プレビス菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが次の配列

5'-CTGATTTC AACAATGAAGC-3' を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項3】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*) 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス カゼイ菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが次の配列

5'-ATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGC-3' を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項4】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*) 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス コリニフォルミス菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが次の配列

5'-GGGACTAGAGTAACTGTTAGTCC-3' を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項5】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス プランタラム菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが次の配列

5'-TGGACCGCATGGTCCGAGC-3' を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項6】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌を選択的に検出するため、ラクト

バチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが配列番号1に記載されるオリゴヌクレオチド配列の内、50番目から200番目までに記載される配列の一部又は全部の配列を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項7】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが配列番号1に記載されるオリゴヌクレオチド配列の内、1番目から500番目までに記載される配列の一部又は全部の配列を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項8】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが配列番号1に記載されるオリゴヌクレオチド配列の一部又は全部の配列を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項9】 検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌を選択的に検出するため、ラクトバチルス スピイーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の16SリボソームRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列の一部を含むオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドが次の配列

5'-TTTTAACATCGGATGGAG-3' を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とする乳酸菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項10】 請求項2、3、4、5または9に記載されたオリゴヌクレオチドの配列のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 請求項2、3、4、5または9に記載されたオリゴヌクレオチド配列を鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的のヌクレオチド配列を増幅させる方法。

【請求項12】 請求項11に記載の方法で増幅されたヌクレオチド配列を、電気泳動、またはクロマトグラフィーで分離し、その結果、認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することで検体中のラクトバチルス属菌の検出を行う方法。

【請求項13】 請求項11に記載の方法で増幅されたヌクレオチド配列を、ゲル電気泳動および核酸染色法により検出する方法。

【請求項14】 請求項2、3、4、5または9記載のオリゴヌクレオチドをDNA検出用プローブとして機能させる方法。

【請求項15】 請求項2、3、4、5または6記載のオリゴヌクレオチド配列が標識物により修飾されたオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ビール混濁菌であるラクトバチルス属の菌、特にラクトバチルスブレビス菌、ラクトバチルス カゼイ菌、ラクトバチルス コリニフォルミス菌、ラクトバチルス プランタラム菌、ラクトバチルス スピーシーズ AB No. 74 菌を検出するためのオリゴヌクレオチド、及びこれを用いる該菌の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】現在、ビール製造における微生物検査では、菌種を同定するには、増殖培養を経て、菌を単離しなければならず、少なくとも7日は要する。その後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験、糖資化性などの多くの性状試験を行うことにより同定を行っている。また、これら一般に行われている同定試験のほか、単離した菌からDNAを抽出し、それを膜上あるいは他の支持体上に固定し、標準菌のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーション試験を行うことにより菌種を同定する方法がある。しかし、この方法も数日を要し、さらに十分な検出感度および選択性を得るのが難しい。

【0003】より迅速な検出方法として、最近では、J. Am. Soc. Brew. Chem. :52(1) 19-23, 1994 に報告されている生物ルミネッセンスを利用したATP発光法により生菌の検出を行う方法があるが、菌種を問わずに検出するため、同定には利用できない。また、ビールに有害な一部の乳酸菌、例えば、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus coryniformis*等については、特開平6-46811及び特開平6-311894に開示されているように乳酸菌に特異的な抗体を使用することによって、比較的早期の同定が可能となっている。しかし、この方法を適用するためには、菌を単離するまでの操作が必要なために、その分日数を要し、さらに十分な検出感度および選択性

を得るのが難しい。

【0004】そこで、さらに迅速な検出法が検討され、最近では、特開平5-15400、特開平6-141899、特開平7-289295、または J. Am. Soc. Brew. Chem. :52(3) 95-99, 1994 に報告されているように、検体となる乳酸菌のDNAを抽出し、このDNAに相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして機能させたPCR法を用いた乳酸菌の検出する方法がある。

【0005】なお、特開平5-15400および特開平6-141899では、ラクトバチルス ブレビスの5SリボソームRNA遺伝子を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドを利用した乳酸菌の検出方法であるが、本発明は、ラクトバチルス ブレビスの5SリボソームRNA遺伝子を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成したオリゴヌクレオチドを用いるものであり、その遺伝子配列の基本的な違いから、ラクトバチルス ブレビスの検出の特異性が前記公報の技術とは異なるものである。

【0006】また、特開平7-289295では乳酸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている *Lactobacillus* sp. DA1. という乳酸菌の遺伝子配列を用い、既知のプライマーでは検出できない乳酸菌を検出することを目的としており、本発明で検出の特異性を検討しようとする乳酸菌とは種が異なっている。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、乳酸菌であるラクトバチルス属由来の16S rRNA遺伝子と選択的にハイブリダイズするヌクレオチド配列または該配列に対する相補的配列を有するヌクレオチドに関する。さらに詳しくは、検体中に存在するラクトバチルス属菌に属するラクトバチルス ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*) 菌、ラクトバチルス チルス コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*) 菌、ラクトバチルス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 菌、ラクトバチルス スピーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌を選択的に検出し、同時に同定できる方法を提供する。

【0008】なお、ラクトバチルス スピーシーズ AB No. 74 菌は、国内のビール醸造場から単離された乳酸桿菌で、上記乳酸菌又は特開平7-289295記載のラクトバチルス スピーシーズ DA1 (*Lactobacillus* sp. DA1) の何れとも異なる菌であり、また、ビールを培地として生育できる特徴をもつ。遺伝子増幅に関する技術はすでに公知であり、Saiki らが開発したPolymerase Chain Reaction 法（以下、PCR法と略す；Science 230, 13-50, 1985）を基に行うことができる。この方法は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応で、迅速・高感度で高い特異性を持ち、かつ簡便であることから、遺伝学的

研究のみならず、近年は、医療分野における病原菌の迅速判定や、食品分野における有害菌の迅速検出にも応用が試みられてきている。PCR法を行うことにより、検体中の僅かな量しか標的配列が存在していなくても、2つのプライマーが挟む標的ヌクレオチド配列は何百万倍にも増幅され、検出が可能までに大量にそのコピーが産生される。また、PCR法を行うには、検体中に存在する菌から核酸成分を遊離させる必要があるが、PCRは標的配列が数分子以上存在すれば増幅反応が進むので、溶菌酵素や界面活性剤を用いた簡便な前処理をするだけで十分に試験に供することができる。そのため、従来の最近検出法に比べ、利用価値が非常に高い。

#### 【0009】

【発明の実施の形態】これらのことを利用すべく、本発明では、ラクトバチルス属菌に属するラクトバチルスブレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌、ラクトバチルスカゼイ (*Lactobacillus casei*) 菌、ラクトバチルスコリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*) 菌、ラクトバチルスプラントラム (*Lactobacillus plantarum*) 菌、ラクトバチルススピーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の各菌の16Sリボソーム遺伝子と特異的にハイブリダイズするように作成したオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR法を行い、認識されるべき配列の検出を行うことにより、検体中に該菌が存在するか否かを迅速、高感度、特異的に判定する。検体は、ビール及びビール製造途中の半製品、または、下水などの嫌気的環境下から採取されたサンプルでもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然のものでも、いずれの使用でも可能である。PCR反応に用いるDNAポリメラーゼは、90℃以上の温度に耐熱性があればよい。PCR反応における温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応で90～98℃、プライマーを鋳型DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応で37～65℃、DNAポリメラーゼを作用させる鎖長反応で50～75℃で行い、これを1サイクルとしたものを数十サイクル行わせることにより、標的配列を増幅させることができる。

【0010】PCR反応後、反応物を電気泳動により分離し、臭化エチジウム等で核酸染色を行い、増幅されたヌクレオチド配列の塩基長が、上述の標的配列の塩基長と等しければ、検体中にラクトバチルスブレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌、ラクトバチルスカゼイ (*Lactobacillus casei*) 菌、ラクトバチルスコリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*) 菌、ラクトバチルスプラントラム (*Lactobacillus plantarum*) 菌、ラクトバチルススピーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の各菌の存在を判定できる。増幅されたヌクレオチド配列の検出には、クロマトグラフィーも有効である。

#### 【0011】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

1. ラクトバチルススピーシーズ (*Lactobacillus* sp.) AB No. 74 菌の16S rRNA遺伝子塩基配列の決定

① *Lactobacillus* sp. AB No. 74 菌からのDNA抽出  
まず、*Lactobacillus* sp. AB No. 74 菌からDNAを抽出した。DNAの抽出は次のように行った。供試菌の菌液1mlを15Krpmで5分間、4℃にて遠心分離した後、上清を捨てた。1ml滅菌水を加えて懸濁し、再び15Krpmで5分間、4℃にて遠心分離し上清を捨てた後、200μlの細胞壁溶解液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.35M Sucrose pH 8.0) に Lysozyme を1mg/ml、N-Acetylmuramidaseを50μg/mlになるように添加) に懸濁し、37℃、30分間保温した。400μlの蛋白質分解溶液 (100mM Tris-HCl, 1.5M NaCl, 20mM EDTA, 2%CTAB, 2%2-Mercaptoethanol pH8.0) にProteaseKを120μg/mlになるように添加) を加え、50℃、60分間保温した後、400μlのフェノール・クロロホルムを加え、攪拌した後に15Krpmで5分間、25℃にて遠心分離し、上清400μlを新しいエッペンチューブに移した。300μlの2-propanolを加え、攪拌した後に-80℃にて10分間静置し、15Krpmで15分間、4℃にて遠心分離して沈殿を得た。冷70%エタノール200μlを加え、15Krpmで5分間、4℃にて遠心分離し、上清を捨てた。残渣を50μlの滅菌水に懸濁し、DNA溶液とした。

【0012】② *Lactobacillus* sp. AB No. 74 菌の16S rRNAの増幅

次に、*Lactobacillus* sp. AB No. 74 菌の16S rRNAの増幅を行った。前述のDNA溶液から得たDNA約20ngをテンプレートとし、表1に示す16S rRNA遺伝子シーケンシングプライマーの1及び11を用いて、PCRを行った。PCRは、供試DNA溶液5μl、10×PCRバッファー (100mM Tris-HCl (pH9.0)、500mM KCl、1%TritonX-100) 5μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 4μl、20mM dNTP混合液0.5μl、プライマー1 0.5μl、プライマー11 0.5μl、Taq DNA polymerase (東洋紡; TAP-101) 0.25μl及び滅菌蒸留水34.25μlを混合し、PCR条件は変性は90～98℃にて1分間、アニーリングは37～60℃にて2分間、伸長は70～75℃にて2分間で30サイクル行った。反応液5μlを1×TBEバッファーを用いた1.2%アガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドにて20分程度染色を行った後、紫外線を照射することによりPCR産物の観察を行った。

【0013】アガロース電気泳動の後、エチジウムブロマイドにて染色し、目的とする約1.5KbpのDNA分子を含むアガロースゲルを剃刀等を用いて切り出した。宝酒造 (株) のSUPRECTM-01 (DNA回収用フィルター付き遠心チューブ) に移した後、ミクロスパーテル等を用いてゲルを細かく碎き、-80℃にて10分間静置し凍結させた。滅

菌水300 $\mu$ lを加えて、5krpmで10分間遠心分離し、遠心チューブ底に溜まったDNA溶液を回収した。得られた溶液300 $\mu$ lに対して等量のフェノール・クロロホルムを加えて15krpmで5分間、25℃にて遠心分離し、上清200 $\mu$ lを新しいエッペンチューブに移した。約400 $\mu$ lの冷エタノールを加え、-80℃にて10分間静置した後に15krpmで5分間、4℃にて遠心分離し、上清を捨てた。冷70%エタノール約150 $\mu$ lを加えた後、15krpmで5分間、4℃にて遠心分離した。上清を捨てた後、減圧乾燥し、50 $\mu$ l滅菌蒸留水に懸濁して16SrDNA溶液とした。

【0014】③ シーケンス反应用テンプレートの調製

上記の16SrDNA約20ngをテンプレートとし、表1に示す各種16SrRNA遺伝子Sシーケンシングプライマーを2と3、1と4、6と7、5と8、10と11、9と12、2と7、1と8、6と13、5と14の計10通りの組み合わせで用い、PCR条件は90～98℃にて1分間、37～60℃にて2分間、70～75℃にて2分間で30サイクル行った。増幅した目的長のDNA分子を、上記と同様の方法で精製し、シーケンシング反応に供した。

【0015】

10 【表1】

| NO. | 名称       | 配列                                   |
|-----|----------|--------------------------------------|
| 1   | 27f      | AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAG            |
| 2   | M27Fa2   | M-AGAGTTTGATC (AC) TGGCTCAGGA (CT) G |
| 3   | 520R     | ACCTACGTATTACCGCGG (GT) GCTGG        |
| 4   | M530Ra2  | M-ACCTACGTATTACCGCGG (GT) GCTGG      |
| 5   | 530f     | GTGCCAGC (AC) GCCGCGG                |
| 6   | M530Fa2  | M-TAACTACGTGCCAGC (AC) GCCGCGG       |
| 7   | 907r     | CCGTCAATTC (AC) TTT (AG) AGTTT       |
| 8   | M890Ra2  | M-TTGGCGTCTACTCCCAGGCG               |
| 9   | 907F     | AAACT (CT) AAA (GT) GAATTGACGG       |
| 10  | M907Fa2  | M-AAACT (CT) AAA (GT) GAATTGACGGGG   |
| 11  | 1522r    | AAGGAGGTG (AT) TCCA (AG) CC          |
| 12  | M1525Ra2 | M-AAGGAGGTG (AT) TCCA (AG) CCGCA     |
| 13  | 1392r    | ACGGGCGGTGTGT (AG) C                 |
| 14  | M1392Ra2 | M-TCTCATGGTGTGACGGCGGTG              |

但し、表中Mは、M13のForward(-29) プライマーの配列：(T)CAGGACGTTGTAAAACGACを示す。

【0016】④ シーケンシング

上記DNAをテンプレートとし、IRD41標識M13 Forward (-29) primerを用いて、LI-COR社DNAシーケンサー取り扱い説明書に従って、シーケンシング反応を行った。同説明書に従って電気泳動及び解析を行った。DNA配列の編集及びデータ解析はDNAsis (日立ソフトウェア) を用いて行った。

【0017】2. 特異的プライマーの決定

ラクトバチルス プレビス (*Lactobacillus brevis*) 菌、ラクトバチルス カゼイ (*Lactobacillus casei*) 菌、ラクトバチルスチルス コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*) 菌、ラクトバチルス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 菌の各乳酸菌の16SrDNA塩基配列に関しては、EMBLのDNAデータベースから情報を得、ラクトバチルス スピーシーズ (*Lactob*

*acillus* sp.) AB No. 74菌については前記1. で得られた配列について、その多様性の認められる領域 (菌種により塩基配列が異なる領域で、塩基配列番号1～500番目の領域に相当する) を図1に並列して示した。

【0018】特異的上流プライマーは、図1や特開平7-289295等の公知の塩基配列情報を参考にして、それぞれの菌に特異的と考えられる20bp程度の塩基配列を選び出し作成した。下流プライマーに関しては、全ての菌に共通なものとして、16SrRNA遺伝子の907番目付近の配列を用いて作成し、ユニバーサルプライマー (以下、UNV1と略す) とした。以上作成したプライマーを表2に示した。

【0019】

【表2】

| NO. | 名称      | 菌種                     | 配列 (5' → 3')              | UNV1と組合せたときの<br>予想DNA分子量<br>(bp) |
|-----|---------|------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 1   | LBP1    | <i>L. brevis</i>       | AGCTTCCGTTGAATGACGT       | 887                              |
| 2   | LBP2    | <i>L. brevis</i>       | CTGATTTCAACAATGAAGC       | 861                              |
| 3   | LBP3    | <i>L. brevis</i>       | GTGGCTTCGGCTATCACITC      | 727                              |
| 4   | LBP4    | <i>L. brevis</i>       | AAGTCGAACGAGCTTCC         | 847                              |
| 5   | LCP1    | <i>L. casei</i>        | ATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGC | 735                              |
| 6   | LCP2    | <i>L. casei</i>        | GAGAAGAATGGTCGGC          | 463                              |
| 7   | LOP1    | <i>L. coryniformis</i> | CACTGACGTCGACCGAAGCTGC    | 864                              |
| 8   | LOP2    | <i>L. coryniformis</i> | CCGAAGCTGCTTGACAGTGGACGT  | 852                              |
| 9   | LOP3    | <i>L. coryniformis</i> | TAACCAATTCAGACCACATGCTCT  | 738                              |
| 10  | LOP4    | <i>L. coryniformis</i> | GGGACTAGAGTAACTGTTAGTCC   | 453                              |
| 11  | LPP1    | <i>L. plantarum</i>    | TGGACCGCATGGTCCGAGC       | 731                              |
| 12  | LPP2    | <i>L. plantarum</i>    | TAACCGCATAACAACITGG       | 764                              |
| 13  | L74p1   | <i>L. sp. No. 74</i>   | GAGTAACGGTTCACCA          | 669                              |
| 14  | L74p2   | <i>L. sp. No. 74</i>   | AGAAGGTTGTTCCGATCGC       | 515                              |
| 15  | L74p3-1 | <i>L. sp. No. 74</i>   | GTCGAACGCATCCCGTTAA       | 884                              |
| 16  | L74p4-3 | <i>L. sp. No. 74</i>   | TTTTAACATCGGATGAG         | 651                              |
| 17  | L74p5   | <i>L. sp. No. 74</i>   | GGTGGAGTAACGGTT           | 673                              |
| 18  | L74p6   | <i>L. sp. No. 74</i>   | CGGTTCAACCAAGGCA          | 663                              |
| 19  | UNV1    | universal primer       | CCGTCAATTCCTTTGAGTTT      | —                                |

各種のプライマーであるオリゴヌクレオチドは公知の方法にて化学合成した。プライマーは滅菌水で100μMに調製してPCR反応に用いた。

【0020】次に前記のプライマーの中からそれぞれの菌種に特異性の高いものを選択するため試験した。*L. brevis* (JCM 1059)、*L. casei* (ATCC334)、*L. plantarum* (JCM1149)、*L. coryniformis* (JCM1164)、*L. lindneri* (DSM20690)、*L. sp. AB No. 74* 菌より前述の方法にてDNAを抽出し、これをテンプレートとして、各乳酸菌DNA

に対する、上記にて作成した上流プライマーの反応性を調査した。また、下流プライマーとしてはUNV1を用いた。

【0021】結果を表3に示すが、上流プライマーとしてLBP2、LCP1、LOP4、LPP1及びL74p4-3を用いた場合、それぞれ対応する乳酸菌DNAのみに反応し、特異性が高いことが確認された。

【0022】

【表3】

| 標準菌               |         |          |         |          |          |          |          |
|-------------------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| NO. 標的菌種          | プライマー   | JCM1059  | ATCC334 | JCM1149  | JCM1164  | DSM20690 | AB No.74 |
|                   |         | L.brevis | L.casei | L.planta | L.coryni | L.lindne | L.sp.    |
|                   |         |          |         | rum      | formis   | ri       |          |
| 1 L.brevis        | LBP1    | +        | -       | -        | +        | -        | +        |
| 2                 | LBP2    | +        | -       | -        | -        | -        | -        |
| 3                 | LBP3    | +        | -       | +        | +        | -        | +        |
| 4                 | LBP4    | +        | +       | -        | -        | -        | -        |
| 5 L.casei         | LCP1    | -        | +       | -        | -        | -        | -        |
| 6                 | LCP2    | -        | +       | +        | +        | -        | -        |
| 7 L.coryniformis  | LOP1    | -        | +       | -        | +        | -        | +        |
| 8                 | LOP2    | -        | -       | +        | +        | -        | -        |
| 9                 | LOP3    | -        | -       | -        | +        | -        | -        |
| 10                | LOP4    | -        | -       | -        | +        | -        | -        |
| 11 L.plantarum    | LPP1    | -        | -       | +        | -        | -        | -        |
| 12                | LPP2    | -        | -       | +        | +        | -        | -        |
| 13 L.sp. AB No.74 | L74p1   | W        | +       | +        | +        | W        | +        |
| 14                | L74p2   | W        | W       | W        | W        | W        | +        |
| 15                | L74p3-1 | -        | -       | -        | -        | -        | +        |
| 16                | L74p4-3 | -        | -       | -        | -        | -        | +        |
| 17                | L74p5   | +        | +       | +        | W        | W        | +        |
| 18                | L74p6   | W        | W       | +        | W        | +        | +        |

+ : 高い特異性    W : 弱い特異性    - : 特異性なし

【0023】以上の結果から最終的には、LBP2、LCP1、LPP1、LOP4及びL74p4-3を特異的な上流プライマーとして選択した。

【0024】3. 検出特異性の確認試験

次に、選択プライマーの対応する各種保存菌に対する反応を調査した。保存しているL.brevis 3株、L.casei 5株、L.coryniformis 2株、L.plantarum 3株よりDNAを抽

出し、各菌DNAをテンプレートとした時の対応する特異プライマーの反応を調査した。

【0025】結果を表4に示すが、各菌について、保存リスト記載の菌株名とPCRの結果が一致しており、十分な信頼性の検出法であることがわかった。

【0026】

【表4】



| 種               | 保存菌名       | 上流プライマー | 反応 |
|-----------------|------------|---------|----|
| L. brevis       | IAM 1082   | LBP2    | +  |
|                 | JCM 1059   | LBP2    | +  |
|                 | JCM 1170   | LBP2    | +  |
| L. casei        | IAM 1045   | LCP1    | +  |
|                 | IAM 1118   | LCP1    | +  |
|                 | JCM 1134   | LCP1    | +  |
|                 | ATCC 334   | LCP1    | +  |
|                 | 微工研菌寄12293 | LCP1    | +  |
| L. coryniformis | JCM 1164   | LOP4    | +  |
|                 | JCM 1166   | LOP4    | +  |
| L. plantarum    | JCM 1149   | LPP1    | +  |
|                 | IAM 1041   | LPP1    | +  |
|                 | 微工研菌寄11912 | LPP1    | +  |

## 【0027】

【発明の効果】従来法では、乳酸菌の菌種を同定するまでに約10日近くかかっていたが、本発明を用いることにより、1～3日以内に迅速かつ明確に、検体中のラクトバチルス プレビス菌、ラクトバチルス カゼイ菌、ラクトバチルス コリニフォルミス菌、ラクトバチルス プランタラム菌、ラクトバチルス スピーシーズ ABN o. 74 菌の各菌を検出し、同時に同定することが可能である。

【0028】しかも、PCR法は、検体の前処理も含めて操作が簡便で、使用する薬品、器具、装置も安価であることから、作業者の熟練を要せず、低コストで信頼性の高い検査が可能となる。

## 【0029】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1524

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Lactobacillus sp.

株名：AB No. 74

特徴を決定した方法：E

## 配列

```

TGATCCTGGC TCAGGATGAA CGCTGGCGGC GTGCCTAATA CATGCAAGTC 50
GAACGCATCC CGTTAAATGA AGTGCTTGCA CATCGGATGA GTGGCGAACT 100
GTGGCGAACT GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCAGA AGCAGGGGAT 150
AACACTTGGA AACAGGTGCT AATACCGTAT AACAACAAA ACCGCATGGT 200
TTTTGTTTGA AAGGTGGTTT CGGCTATCAC TTCTGGAAGG ACCCGCGGCG 250
TATTAGCTAG TTGGTGGAGT AACGGTTCAC CAAGGCAATG ATACGTAGCC 300
GACCTGAGAG GGTAAATCGGC CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAATC 350
CTACGGGAGG CAGCAGTAGG GAATCTTCCA CAATGGACGA AAGTCTGATG 400
GAGCAACGCC GCGTGAGTGA AGAAGGTTTT CGGATCGTAA AACTCTGTTG 450
TTGAAGAAGA ACACGTTTGA GAGTAACTGT TCAGACGTTG ACGGTATTCA 500
ACCAGAAAGC CACGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG 550
TGGCAAAGCG TATCCGGATT TATTGGGCGT AAAGCGAGCG CAGGCGGTTA 600
CTTAAGTCTG ATGTGAAAGC CTTGCGCTTA ACCGGAGAAG TGCATCGGAA 650
ACTGGGTAAC TTGAGTGCAG AAGAGGACAG TGGAACTCCA TGTGTAGCGG 700
TGAAATGCGT AGATATATGG AAGAACACCA GTGGCGAAGG CGGCTGTCTG 750
GTCTGTAAC TACGCTGAGG CTCGAAAGCA TGGGTAGCGA ACAGGATTAG 800
ATACCCTGGT AGTCCATGCC GTAAACGATG AATGCTAGGT GTTGGAGGGT 850
TTCCGCCCTT CAGTGCCGCA GCTAACGCAT TAAGCATTCC GCCTGGGGAG 900
TACGACCGCA AGTTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG 950

```

|            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| GTGGAGCATG | TGTTTAATT  | CGAAGCTACG | CGAAGAACCT | TACCAGGTCT | 1000 |
| TGACATACTG | TGCTAACCTA | AGAGATTAGG | CGTTCCTTC  | GGGGACGCAG | 1050 |
| ATACAGGTGG | TGCATGGCTG | TCGTCAGCTC | GTGTCGTGAG | ATGTTGGGTT | 1100 |
| AAGTCCCGCA | ACGAGCGCAA | CCCTTATTGT | CAGTTGCCAG | CATTTAGTTG | 1150 |
| GGCACTCTGG | CGAGACTGCC | GGTGACAAAC | CGGAGGAAGG | TGGGGATGAC | 1200 |
| GTCAAGTCAT | CATGCCCTT  | ATGACCTGGG | CTACACACGT | GCTACAATGG | 1250 |
| ATGGTACAAC | GAGTTGCGAA | CTCGCGAGAG | CAAGCTAATC | TCTTAAAGCC | 1300 |
| ATTCTCAGTT | CGGACTGTAG | GCTGCAACTC | GCCTACACGA | AGTCGGAATC | 1350 |
| GCTAGTAATC | GCGGATCAGC | ATGCCGCGGT | GAATACGTTT | CCGGGCCTTG | 1400 |
| TACACACCGC | CCGTCACACC | ATGAGAGTTT | GCAACACCCA | AAGTCGGTTC | 1450 |
| GGTAACCTTC | GGGAGCCAGC | CGCCTAAGGT | GGGGCAGATG | ATTAGGGTGA | 1500 |
| AGTCGTAACA | AGGTAGCCGT | AGAG       | 1524       |            |      |

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 Q 1/68

C 1 2 R 1:225)